

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-142122

(43)Date of publication of application : 08.06.1993

---

(51)Int.Cl.

G01N 1/28

G01N 33/53

G01N 33/543

---

(21)Application number : 03-326749

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 15.11.1991

(72)Inventor : TAMAI TOYOHIRO

---

**(54) METHOD FOR DRYING AND FIXING SOLID-PHASE CELL**

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a method for drying and fixing solid-phase cells by which solid-phase cells can be dried and fixed while the deactivation of an idiocratic substance is prevented.

**CONSTITUTION:** An erythrocyte solidifying plate is obtained by solidifying erythrocytes on the well-bottom plates of a U-bottom plate in a single-layer state after the bottom surface of each well is coated with wheat germ lectin (WGA). Then a drying solution (containing 20wt.% saccharose, 0.2wt.% bovine serum albumin, and 0.05wt.% sodium azide) is poured on the plate at a rate of 100  $\mu$ l/well. After leaving the plate as it is for 3 minutes, the drying solution is thrown away from the plate. After that, the plate is dried with air for 30 minutes at 30° C in a dry incubator and kept 4 hours under a reduced-pressure condition in a decompression drier. Thus a dried-erythrocyte solidifying plate is obtained.

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公 開 特 許 公 報 ( A )

(11)特許出願公開番号

特開平5-142122

(43)公開日 平成 5 年(1993) 6 月 8 日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 1/28	J	8105-2 J		
33/53	Y	8310-2 J		
33/543	Q	7906-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 8 頁)

(21)出願番号 特願平3-326749

(22)出願日 平成 3 年(1991)11月15日

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社  
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号

(72)発明者 玉井 豊廣

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目43番 2 号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦

(54)【発明の名称】 固相細胞の乾燥固定方法

(57)【要約】

【目的】特異性物質の失活するのを防止しつつ固相細胞を乾燥固定し得る固相細胞の乾燥固定方法を提供する。

【構成】U底プレートの各ウエルの底面にコムギ胚芽レクチン(WGA)をコーティングした後、赤血球をウエル底面に単層状に固相化して赤血球固相化プレートを得る。この後、赤血球固相化プレートに、乾燥溶液(サッカロース20重量%、ウシ血清アルブミン0.2 重量%、アジ化ナトリウム0.05重量%含有)を100  $\mu$  l /well 分注する。次いで、3分間放置した後、乾燥溶液を捨てて水切りする。次にドライインキュベーターにより30℃で30分間風乾し、更に減圧乾燥機により減圧下で4時間乾燥を行って、乾燥赤血球固相化プレートを得る。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 組織又は細胞を担体に固相化した後、前記組織又は前記細胞に乾燥溶液を接触させて前記組織又は前記細胞を乾燥固定することを特徴とする固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項2】 担体に固相化した組織又は細胞に低張液を接触させて、前記組織又は前記細胞の内容物を溶出させた後、前記組織又は前記細胞を乾燥固定することと特徴とする請求項1記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項3】 乾燥溶液が、糖類及びペプチドを含むことと特徴とする請求項1記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項4】 乾燥溶液が、サッカロース20重量%及びウシ血清アルブミン0.2重量%を含有することと特徴とする請求項3記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項5】 乾燥溶液が塩を含むことを特徴とする請求項1記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項6】 塩が、塩化ナトリウム、リン酸塩又は塩化カリウムである請求項5記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項7】 乾燥溶液を接触させて組織又は細胞を乾燥固定した後、真空乾燥、自然乾燥又は凍結乾燥を行うことを特徴とする請求項1記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項8】 担体が支持体であることを特徴とする請求項1記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項9】 組織又は細胞を担体に固相化する際に使用する結合剤が、レクチン又は抗体であることを特徴とする請求項1記載の固相細胞の乾燥固定方法。

【請求項10】 レクチンがコムギ胚芽レクチン、リシン又はレンズマメレクチンであることを特徴とする請求項9記載の固相細胞の乾燥固定方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、例えば、免疫反応に利用する組織又は細胞を固相化した後乾燥固定する固相細胞の乾燥固定方法に関する。

**【0002】**

【従来の技術】従来、固相化された組織又は細胞を用いる免疫反応としては、マイクロプレート等の反応容器の壁面に対して、赤血球を固相化する方法（特開平2-124464号）や、血小板を固相する方法（柴田らのInternational Archives of Allergy and Applied Immunology, 74, 93-96, 1984）等が知られている。このような免疫反応は、例えば、赤血球の血液型（ABO, Rh）の検査に適用されている。血液型の検査は、輸血時の安全確保の為に必要である。また、細胞上に存在する種々の特異性物質（例えば、血液型物質、HLA, 血小板抗原等）と、特異反応物との反応を行うことによって、数々の情報を得られる。

【0003】しかし、上述の固相化した組織又は細胞を

用いた免疫反応では、固相化した組織又は細胞は生きたものであり、長期にわたって保存できず、組織又は細胞の寿命（有効期間）が問題となる。例えば、特開平2-124464号に記載された、赤血球を、例えば、マイクロプレートウェル、試験管、スライドガラスのような支持体に固相化する方法では、生きた細胞を用いているため、固相化した赤血球を長時間にわたって保存できない。ここで、赤血球を保存するために、人体より採血した後、例えば、アルセバー液やMAP液に、赤血球を浮遊させておいても、採血直後から徐々に溶血してしまう。この結果、数週間～1ヶ月で、固相化した赤血球を試薬として使用できなくなってしまう。また、Ortho社等より市販されているスクリーニング用O型血球も、同様の理由で有効期限が設定され、長期保存に適していない。

【0004】このような組織又は細胞の保存期間を延長する手段として、組織又は細胞を固定することが考えられる。組織又は細胞の固定方法は、例えば細胞診等において種々の方法が行なわれている。例えば、「細胞診教本—その基礎と実際—」に開示されるような、アルコール等の溶媒、重クロム酸等の重金属、ホルマリン、グルタルアルデヒド等の固定剤を用いて、組織又は細胞内のタンパク質を不溶性にする方法が一般的である。また、特公昭61-6941号にも赤血球の固定方法が開示されている。他にも、組織又は細胞を、煮沸、乾燥凍結することも固定方法の1つであると考えられる。

【0005】上述の固定剤を用いる固定方法等では、先に述べたように組織又は細胞のタンパク質を変性させるため、組織又は細胞の形態の保存や染色には問題ない。しかし、上述のような免疫反応に使用する組織又は細胞を固定するには、その組織又は細胞上の特異性物質が変性してしまい適用できない。このような欠点は、特開平2-151765号の383頁左下欄第4行目～384頁、左下欄第4行目に記載されている。

【0006】これに対して、組織又は細胞上の特異性物質を変性させないで組織又は細胞を固定する方法として、乾燥による組織又は細胞の固定方法が考えられる。例えば、各種抗原（ウイルス・細菌など）や抗体を結合させた人工・天然粒子を凍結乾燥する方法が知られている。また、担体上に固相化した組織又は細胞を乾燥固定する方法としては、イムコア社の固相動物細胞の乾燥固定化方法（特開平2-151765号）が知られている。

**【0007】**

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述の特開平2-151765号（以下、文献1と記す）に記載された乾燥固定方法は、次のような欠点を有する。まず、文献1の385頁右下欄第9行目～第12行目、386頁左下欄第16行目～第18行目にも記載されているが、文献1の乾燥固定方法を実施するには、赤血球、

血小板等の細胞を固相する場合に、正味正電荷を帯びた有機染料で染色した固相支持体上に細胞の単層を形成している。この正味正電荷を帯びた有機染料を使用した細胞の固相化は、タンパク質により阻害される。このため、固相化する細胞の表面等にタンパク質が付着してはならない。また、その後使用する乾燥溶液もタンパク質を含んではならない。従って、文献1の乾燥固定方法では、細胞からタンパク質を除くために遠心洗浄等を行う必要がある。しかし、タンパク質を含まない溶液中に細胞を浮遊させた場合にも、除々にタンパク質が細胞から遊離してくる。例えば血小板等は、輸血学会誌vol. 36, No. 2 には、生理食塩水等に浮遊しておくだけで抗原が抽出されることが記載されている。このような場合には、再度細胞を洗浄する必要がある。上述のように、文献1の乾燥固定方法では、タンパク質を除去することが不可欠であり、操作が極めて繁雑になる欠点があった。

【0008】一方、乾燥溶液を用いて細胞を乾燥固定した後にさらに乾燥するのに、文献1の乾燥固定方法では、文献1の387頁左上欄第1行目～右上欄第2行目には、一般的に行われている真空乾燥やけい藻土やシリカ粒子を使用した乾燥では、満足度が低下するため、分子ふるい乾燥剤を用いて、長時間かけて、ゆっくり乾燥することが好ましいことが記載されている。しかし、この分子ふるい乾燥剤を用いた乾燥方法は、分子ふるい乾燥剤が比較的高価であり、かつ、乾燥に長時間を要するため、工業的に大量に固相細胞を乾燥固定する場合には製造時間も制約されるので不適当である。このため、工業的に安定かつ安価に乾燥固定した固相細胞を製造するには、真空乾燥や自然乾燥でも十分満足し得るような固相細胞の乾燥固定方法が要求されている。

【0009】さらに、文献1の固相細胞の乾燥固定方法では、上述のようにタンパク質が全く存在しないことが要求されているが、タンパク質が存在しない条件下で固相細胞の乾燥固定を行った場合、次のような問題がある。

【0010】一つは、通常、抗原や抗体を保存する際に、その反応性や特異性の失活を防止するために行なわれるタンパク質の添加を行えないことである。例えば、抗原や抗体を感作した粒子を凍結乾燥する際に、乾燥溶液に糖以外にウシ血清アルブミン（以下、BSAと記す）、動物血清のようなタンパク質を添加することが多い。

【0011】例えば、特公平2-30668号の180頁の表1には、乾燥溶液の組成と感度（反応性）の一覧が示されているが、このうち、優れた感度を示すのは、タンパク質（例えば、BSA）が添加されているものが多い。また、特開昭62-209362号には、糖に血清アルブミンを添加した乾燥溶液を用いた、凍結乾燥した感作血球の作成方法が開示されている。また、市販さ

れている抗体や抗原感作粒子の凍結乾燥メディウムの一覧表のほとんどの、BSAや動物血清のようなタンパク質が添加されていることが示されている。

【0012】従って、文献1の固相細胞の乾燥固定方法では、乾燥溶液にタンパク質が存在する条件下で固相細胞の乾燥固定を行えないので、特異性物質の失活は防止するために、タンパク質を添加できない。

【0013】もう一つは、完成した固相細胞を使用して、酵素免疫測定法のような免疫学的反応を行った場合に、通常実施されるブロッキング処理が行えないことである。ブロッキング処理とは、タンパク質により本来の特異的反応ではない反応（非特異的反応）を防止することである。この結果、文献1の固相細胞の乾燥固定方法に従って作成した赤血球を使用した免疫反応では、ブロッキング処理を行えないので、組織又は細胞上の特異反応物質が非特異反応を起す可能性が高い。

【0014】本発明は、かかる点に鑑みてなされたものであり、特異性物質の失活するのを防止しつつ固相細胞を乾燥固定し得る固相細胞の乾燥固定方法を提供する。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、組織又は細胞を担体に固相化した後、前記組織又は前記細胞に乾燥溶液を接触させて前記組織又は前記細胞を乾燥固定することを特徴とする固相細胞の乾燥固定方法を提供する。

【0016】以下、本発明の固相細胞の乾燥固定方法を、さらに詳細に説明する。

【0017】本発明の固相細胞の乾燥固定方法に用いる乾燥溶液は、糖類及びペプチドを含有するものが好ましい。ここで糖類としては、グルコース、ラクトース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、三糖類、または、デキストラン等の多糖類を挙げることができる。これらのうち、特にサッカロースが有効である。糖類の濃度は、0.1重量%以上50重量%以下が望ましい。

【0018】また、ペプチドは、特異性物質の失活を防止するために添加される。ペプチドとしては、例えば、BSA、ゼラチン、ゼラチン加水分解物のようなキャリアタンパクやペプチドが好ましい。

【0019】特に好ましい乾燥溶液は、20重量%サッカロース、0.2重量%BSAを含有するものである。

【0020】さらに、乾燥溶液には、浸透圧を制御するために適宜塩類を添加してもよい。ここで用いられる塩類としては、塩化ナトリウム、リン酸塩、塩化カリウムが好ましいが、他の塩類も使用可能である。

【0021】また、本発明の固相細胞の乾燥固定方法では、組織又は細胞を担体に固相化する際に、レクチン又は抗体を使用することが好ましい。レクチンとしては、コムギ胚芽レクチン（以下、WGAと記す）、リシン（Ric in）（ヒマメレクチン）又はレンズマメ（Lent il）レクチンを用いることができる。この

ような結合剤を使用して、細胞を例えば単層状に固相化する。

【0022】組織又は細胞を固相化する担体は、マイクロプレートのウェル、ガラス試験管、スライドガラス等の支持体が好ましい。

【0023】本発明の固相細胞の乾燥固定方法では、組織又は細胞を固相化すると同時に、または終了後に、上述のような乾燥溶液を組織又は細胞に接触させて、乾燥固定を行う。この後、組織又は細胞を軽く遠心等して水切りを行い、約37℃のインキュベーター等の中で風にあてて乾燥させたり、完全に乾燥するために真空乾燥や凍結乾燥を行ってもよい。

【0024】また、組織又は細胞の固相化は、組織又は細胞を乾燥溶液に直接浮遊させて行うことも可能である。この方法によれば、満足度はやや低下するものの細胞の固相と乾燥溶液による乾燥固定処理が一度に行える利点がある。

【0025】また、特異性物質の活性を保つように、組織又は細胞を低張液に接触させて内容物を溶出（例えば溶血）させた後、乾燥溶液に接触させて乾燥固定することもできる。

【0026】本発明の固相細胞の乾燥固定方法は、例えば、赤血球、白血球、血小板等の表面等に抗原のような特異的反応物質を担体上に固相化し、乾燥固定するのに適用できる。

【0027】また、本発明の固相細胞の乾燥固定方法に従って製造された固相細胞は、特開平2-124464号に示されているような、磁性体封入の抗体感作粒子、酵素を用いた酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光抗体法のような免疫反応に利用できる。特に、磁性体粒子を用いたアッセイ系に最適である。

【0028】

【作用】本発明の固相細胞の乾燥固定方法では、組織又は細胞をレクチン又は抗体を使用して担体に固相化しているので、担体と組織又は細胞の結合がタンパク質により阻害され難い。これにより、固相化する組織又は細胞の表面等からタンパク質を除去する必要がない。また、乾燥溶液中にタンパク質を添加しても、組織又は細胞の固相化状態に何ら影響を与えずに、乾燥固定を行うことができる。この結果、組織又は細胞上の特異反応物質の失活を防止するために乾燥溶液にタンパク質を添加できる。さらに、乾燥固定した組織又は細胞を使用して、免疫反応を行う際にブロッキング処理を施して、非特異的反応を防止できる。

【0029】

【実施例】

実施例1

1-1. 赤血球固相化用マイクロプレートの作成

Nvnc社のU底プレート（Maxisorp Typ

e）に、WGAを10 $\mu$ g/mlの濃度に0.01Mリン酸緩衝液（以下、PBSと記す）pH=7.0に溶解したものを、50 $\mu$ l/well分注した。この後、このU底プレートを室温で30分間インキュベートした後、同PBSで5回洗浄して、WGAでコーティングしたウェルを有する赤血球固相化用マイクロプレートを得た。

【0030】1-2. 赤血球の固相化

抗原性が既知のスクリーニング用O型赤血球サージスクリーン1（Ortho社製）を、PBSで約1.0重量%になるように希釈懸濁した後、1-2で得た赤血球固相化用マイクロプレートに25 $\mu$ l/well分注し、10分間室温で静置した。この後、生理食塩水を用いて各ウェル3回を洗浄して、赤血球をウェル底面に単層状に固相化した赤血球固相化プレートを得た。

【0031】1-3. 赤血球の乾燥

1-2で得た赤血球固相化プレートに、乾燥溶液（サッカロース20重量%、BSA0.2重量%、アジ化ナトリウム0.05重量%含有）を100 $\mu$ l/well分注した。次いで、赤血球固相化プレートを3分間放置した後、乾燥溶液を捨てて水切りした。次に、ドライインキュベーターにより、赤血球固相化プレートを、30℃で30分間風乾し、更に、減圧乾燥機により減圧下で4時間乾燥を行って、乾燥赤血球固相化プレートを得た。得られた乾燥赤血球固相化プレートでは、赤血球は、乾燥した状態でウェルの底面に固相化されており、ウェルは淡茶色に見えた。このウェル底面に乾燥固定された赤血球像を図1の顕微鏡写真に示す。図1から明らかな如く、赤血球は、ウェル底面に形態を維持しまま、単層状に乾燥固定されている。

【0032】1-4. 抗体の検出

1-3で得た乾燥赤血球固相化プレートに、LISS（低イオン等張溶液）を25 $\mu$ l/well分注した。このとき、乾燥固定された赤血球は、LISSで湿潤されて復元されて溶血し、赤血球像は見えなくなった。この後、抗D血清及び抗体を持たない健常者の血清を所定のウェルに分注した。次に、37℃で10分間インキュベートし、各ウェルを生理食塩水で6回洗浄した。この後、磁性体封入抗ヒトIgG感作粒子（オリンパス光学工業（株）製）の懸濁液を、25 $\mu$ l/well分注した。次に、乾燥赤血球固相化プレートを磁石上に3分間載置して、パターン形成した。対照として、同じ赤血球を固相化した乾燥固定していない、非乾燥赤血球固相化プレートを使用して同様の操作を行った。

【0033】このようにして、乾燥赤血球固相化プレート及び非乾燥赤血球固相化プレートにおいて抗D血清を用いてアッセイを行い、抗D血清の反応性を評価した。この結果を表1に示す。

【0034】

【表1】

プレート の種類	抗D血清の希釈倍率								陰性 血清
	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	
乾燥	++	++	++	++	±	±	-	-	-
非乾燥	++	++	++	++	±	-	-	-	-

\* ++ : ウェル底面全体に均一に広がったパターン

+ : ++のパターンの外周部が崩れて縮小ぎみのパターン

- : ウェル中心にボタン状に集まったパターン

± : +パターンと-パターンの中間の広がりをもつパターン

表1から明らかなように、乾燥赤血球固相化プレートでは、抗D血清が非乾燥赤血球固相化プレートと略同等の反応性で免疫反応を起した。この結果、乾燥固定による抗原性の低下はないことが確認された。

#### 【0035】実施例2

実施例1と同様の乾燥赤血球固相化プレートに、表2に示すOrtho社及びBCA社（コスモバイオ（株））

製の抗血清8種（ただしLe<sup>a</sup>は患者血清）を用いて、実施例1と同様にアッセイを行い、赤血球抗原の有無及び各種抗血清の反応性を評価した。この結果を表2に示す。

#### 【0036】

【表2】

	抗血清								陰性 血清
	D	E	$\bar{c}$	$\bar{k}$	$\bar{F}_y^b$	Jk <sup>a</sup>	Le <sup>a</sup>	$\bar{s}$	
赤血球の 抗原の有無	有	有	有	有	有	有	有	有	
反応性	++	++	++	++	++	++	++	++	-

\* 表中 ++及び-は、表1と同じ意味を表す。

表2から明らかなように、各種の赤血球の抗原が抗原性を保持しており、特に吸着抗原というLe<sup>a</sup>抗原も保持していた。

#### 【0037】実施例3

WGA以外の結合剤、すなわち、リシン、レンズマメレクチン、ポリエチレンジイミン（PEI）を使用して、乾燥赤血球固相化プレートを作成した。リシン、レンズマメレクチンは、10  $\mu$ g/mlの濃度にPBSに溶解して、Nvnc社のU底プレートを分注した。その後、U底プレートを、室温で30分インキュベートした。

【0038】一方、PEI（ナカライテスク社製）を0.01重量%の濃度にPBSで希釈したものを、同じくNvnc社のU底プレートに、50  $\mu$ l/well分注し

た。このU底プレートを、室温で30分インキュベートした。

【0039】このようにして作成した、リシン、レンズマメレクチン、PEIでウェル底面をコーティングした赤血球固相化用マイクロプレートに、実施例1と同様の手順で抗原性が既知のスクリーニング用O型赤血球を固相化した後、固定乾燥して乾燥赤血球固相化プレートを作成した。作成した各種乾燥赤血球固相化プレートにおいて、抗D血清及び陰性血清を用いてアッセイを行い、血清の反応性を評価した。この結果を表3に示す。

#### 【0040】

【表3】

結合剤	抗D血清	陰性血清
リシン	++	-
レンズマメレクチン	++	-
PEI	++	-

\*表中 ++及び-は、表1と同じ意味を表す。

表3から明らかなように、陰性のパターンにやや差があるものの、WGA以外の結合剤も十分に使用可能であることが確認された。

#### 【0041】実施例4

固相化した赤血球を乾燥溶液で乾燥固定した後に凍結乾燥した場合について説明する。

【0042】実施例1の1-2で得た赤血球固相化用マイクロプレートに、赤血球サージスクリーン(Ortho社製)を固相化した後、乾燥溶液(サッカロース20重量%、BSA0.2重量%、アジ化ナトリウム0.05重量%含有)を100 $\mu$ l/well分注した。次に、この赤血球固相化プレートを3分間放置した後、乾燥溶液を捨てて水切りした。この後、予め-40℃に冷却しておいた凍結乾燥機[ラブコンコ(Labconco)社製;Stopping Tray Dryer]に移して、-40℃まで凍結処理した後、-20℃で一昼夜(約20時間)減圧して、凍結乾燥を行った。

【0043】このようにして作成した乾燥赤血球固相化プレートにおいて、抗D血清又は陰性血清を用いてアッセイを行ったところ、実施例1と同様に、陽性、陰性の区別ができた。

#### 【0044】実施例5

赤血球の形態を残さずに、その内容物を溶出させた赤血球(赤血球ゴースト)を乾燥固定した場合について説明する。

【0045】まず、実施例1の1-2で得た赤血球固相化用マイクロプレートの各ウエルの底面に、実施例1と同様にして赤血球を固相化した。次に、各ウエルに、蒸留水を100 $\mu$ l/well分注した後、1分間放置して赤血球を溶血させた。この後、蒸留水を捨てて、表4に示す乾燥溶液a~fを異なるウエルに注ぎ入れ、3分間放置した後、乾燥溶液を捨てて水切りした。次いで、実施例1と同様に、赤血球を乾燥固定して、ウエルの底面に赤血球ゴーストが固相化された乾燥赤血球固相化プレートを得た。

【0046】得られた乾燥赤血球固相化プレートを用いて、実施例1と同様に、抗D血清又は陰性血清でアッセイを行い、その反応性を評価した。この結果を表4に示す。

#### 【0047】

#### 【表4】

	乾燥溶液	抗D血清	陰性血清
a	20重量%サッカロース、0.2重量%BSA	++	不良**
b	10重量%サッカロース、0.2重量%BSA	++	不良
c	5重量%サッカロース、0.2重量%BSA	++	-
d	2.5重量%サッカロース、0.2重量%BSA	++	-
e	1.25重量%サッカロース、0.2重量%BSA	++	-
f	0.05M PB, 0.45重量%NaCl, 2.5重量%サッカロース、0.2重量%BSA	++	-

\* ++, -は、表1と同じ意味を表す。

\*\* 輪郭に滲んだ広がりをもつパターン

表4から明らかなように、溶血した赤血球を乾燥固定するには、等張以下の乾燥溶液(c~f)が有効であることがわかった。

【0048】また、溶血させた赤血球をウエルの底面に乾燥固定したときの赤血球像を図2の顕微鏡写真に示す。図2から明らかなように、溶血した赤血球は、図1

に示す赤血球像とは異なり、その形態が崩れて、いわゆるゴースト状態で固相化され、そのまま乾燥固定されたことがわかる。

#### 【0049】実施例6

サッカロースの濃度を、表5に示すように変更した乾燥溶液I～VIIと、BSAを添加しなかった乾燥溶液VII I, IXと、サッカロースに代えて、ラクトース、グルコ

ースを用いた乾燥溶液X, XIを用いた以外は、実施例1と同様の手順に従って、乾燥赤血球固相化プレートを作成し、各乾燥赤血球固相化プレートにおいて、抗D血清又は陰性血清を用いてアッセイを行い、その反応性を評価した。その結果を表5に示す。

#### 【0050】

#### 【表5】

	乾燥溶液	抗D血清	陰性血清
I	40 重量%サッカロース, 0.2 重量%BSA	++	—
II	20 重量%サッカロース, 0.2 重量%BSA	++	—
III	10 重量%サッカロース, 0.2 重量%BSA	++	—
IV	5 重量%サッカロース, 0.2 重量%BSA	++	—
V	2.5重量%サッカロース, 0.2 重量%BSA (一部溶血)	++	不良**
VI	1.25重量%サッカロース, 0.2 重量%BSA (溶血)	++	不良**
VII	0.05M PB, 0.45重量%NaCl, 2.5 重量% サッカロース, 0.2 重量%BSA	++	—
VIII	5重量%サッカロース	++	不良
XI	10 重量%サッカロース	++	不良
X	20 重量%ラクトース, 0.2重量%BSA	++	—
IX	20 重量%グルコース, 0.2重量%BSA	++	—

\* ++, —は、表1と同じ意味を表す。

\*\* 輪郭に滲んだ広がりをもつパターン

表5から明らかなように、赤血球を溶血せずに固相化した後、乾燥固定する場合には、溶血を防ぐために等張以上になるような濃度でサッカロース、ラクトース又はグルコースを含有し、かつ、BSAを添加した乾燥溶液 (I～IV, X, XI) が好ましいことが確認された。

#### 【0051】実施例7

赤血球を乾燥溶液中に懸濁して固相化を行った場合について説明する。まず、乾燥溶液[0.05M PB、塩化ナトリウム0.45重量%、サッカロース2.5重量%、BSA0.2重量%含有]に、Ortho社の赤血球、サージスクリーンCell (Rh<sup>+</sup>) を濃度が約0.7重量%になるように希釈懸濁した。この赤血球の懸濁液を、実施例1の1-2に従って作成した赤血球固相化用プレートに、25μl/well分注し、室温で10分間静置した。この後、結合しなかった赤血球を含む乾燥溶液を捨てて水切りした。次に、実施例1と同様の手順に従って、固相化した赤血球を乾燥固定して、乾燥赤

血球固相化用プレートを得た。得られた乾燥赤血球固相化用プレートにおいて、抗D血清及び陰性血清を用いてアッセイを行った結合、実施例1と同様に、陽性、陰性を区別できた。

#### 【0052】実施例8

#### 血小板の乾燥固定方法

血小板PLA<sup>1</sup> が陽性の被験者より採血しACDを添加した血漿を、10分間遠心して血小板豊富血漿(Platelet Rich Plasma: PRP)を得た。得られたPRPの10重量%にあたる量のACD液を加えて1100Gで15分間遠心して、血小板濃縮物(Platelet Concentrate: PC)を得た。得られたPCを生理食塩水で2回洗浄した。洗浄後、約10万個/μlの血小板濃度になるように調整した血小板溶液を、実施例1の1-2で作成した赤血球固相化用マイクロプレートと同様のWGAをウエル底部にコーティングしてなるマイクロプレートに、25μl/well分注した。このマイクロプレート



を、プレート遠心機により、650Gで5分間遠心して、ウェル底部に血小板を固相化した。

【0053】この後、クロロキン溶液を50 $\mu$ l/well分注し、室温で30分間静置した。次に、クロロキン溶液を除き、水切りした後、生理食塩水で3回洗浄した。

【0054】次いで、各ウェルに、乾燥溶液（サッカロース20重量%、BSA0.2重量%を含有する水溶液）を、100 $\mu$ l/well分注し、3分間静置した。この後、乾燥溶液を除き、水切りして、実施例1と同様の手順に従って、固相化した血小板を乾燥して、乾燥固定血小板プレートを得た。

【0055】得られた乾燥固定血小板プレートにおいて、anti-PLT-オリビオ-MPHA〔商品名：オリンパス光学工業（株）製のPLA<sup>+</sup>陽性コントロールと、PLA<sup>-</sup>陰性コントロールを用いてアッセイを行った。この結果、陽性、陰性を明瞭に区別することができた。

【0056】

【発明の効果】本発明の固相細胞の乾燥固定方法によれば、レクチン又は抗体を用いて組織又は細胞を固相化する。これにより、組織又は細胞から溶出したタンパク質等の存在に影響されずに組織又は細胞を固相化できる。

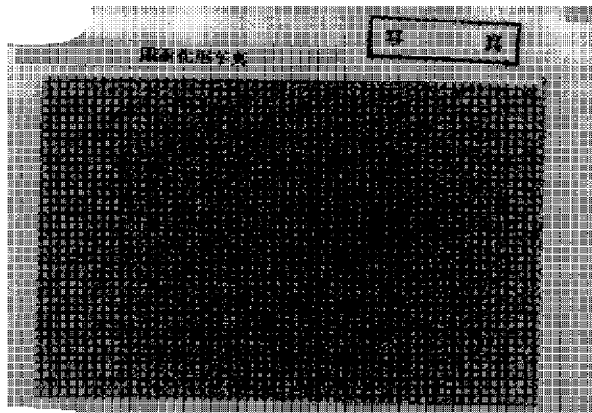
また、固相化した組織又は細胞を、タンパク質を含む乾燥溶液に接触させて乾燥固定する。これにより、乾燥固定処理において、組織又は細胞上の特異反応物質が失活するのを略完全に防止できる。また、この固相細胞を免疫反応に利用する際にブロッキング処理を施して非特異反応を低減することができる。さらに、組織又は細胞を乾燥固定したので、固相化した組織又は細胞の保存性を著しく向上できる。この結果、免疫反応を利用した検査時間を大幅に短縮できると共に、固相化した組織又は細胞の試薬としての有効期間を著しく延長できる等顕著な効果を奏する。特に、本発明の効果は、従来十数種類の生の赤血球を使用し、多くの工程及び時間、試薬を必要としていた抗体同定において顕著である。さらに、各々のウェルに夫々抗原性の異なるパネル血球を乾燥固定しておくことで、より迅速でかつ低コストな抗体同定が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の固相細胞の乾燥固定方法に従って乾燥固定された赤血球像である生物の形態を示す写真。

【図2】本発明の固相細胞の乾燥固定方法に従って溶血した後乾燥固定された赤血球像である生物の形態を示す写真。

【図1】



【図2】

